

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 17, 1979, pp. 739–745

## Eigenschaften und Bedeutung von Makro-Kreatinkinasen

Von W. Stein, J. Bohner, M. Eggstein

Medizinische Klinik Tübingen, Abteilung für Innere Medizin IV (Direktor Prof. Dr. M. Eggstein)

und

H. Lang

Biochemische Forschung, E. Merck Darmstadt

(Eingegangen am 18. Juli/4. Oktober 1979)

Dem Gedenken an Professor Dr. Gábor Szász gewidmet

**Zusammenfassung:** Seren von sieben Patienten fielen durch einen ungewöhnlich hohen Kreatinkinase-MB/Gesamt-Kreatinkinase-Quotienten im Immuninhibitionstest auf. Die elektrophoretische Auftrennung der Isoenzyme der Kreatinkinase ergab in diesen Fällen eine atypische Bande mit geringer elektrophoretischer Mobilität. Durch Ausschlußchromatographie ließ sich in allen Seren Makro-Kreatinkinase nachweisen. Weitere chromatographische, elektrophoretische und immunologische Untersuchungen zeigten bei sechs Patienten, daß diese Makro-Kreatinkinase aus an Immunglobulin G gebundenem Isoenzym Kreatinkinase-BB besteht.

### *Properties and significance of macro-creatine kinases*

**Summary:** Sera from seven patients with an unusual high ratio of creatine kinase-MB versus total creatine kinase, as found in the immunoinhibition test, were investigated. In every case, the electrophoretic separation of the isoenzymes showed a slow moving band, and exclusion chromatography showed the presence of macro-creatine kinase. Further chromatographic, electrophoretic and immunological investigations indicated that the macro-creatine kinases in six cases are complexes of creatine kinase-BB linked to immunoglobulin G.

### Einleitung

Seit der Einführung des Immuninhibitionstests (1) und des Immunpräzipitationstests (2) zur Isoenzymdiagnostik der Kreatinkinase (ATP:Kreatin-Phosphotransferase, EC 2.7.3.2) fanden sich – mit einer Frequenz von ungefähr 1:1000 – Patienten, die persistierende Aktivitäten des Isoenzyms Kreatinkinase-BB im Serum aufwiesen. Ein Zusammenhang mit einer Erkrankung war nicht nachweisbar; daher wurde dieses Phänomen als "idiopathische Kreatinkinase-BB" bezeichnet (3,4). Unabhängig davon wurden aufgrund elektrophoretischer Untersuchungen atypische Isoenzyme der Kreatinkinase (CK-AT) mitgeteilt (5,6,7), die eine geringe elektrophoretische Mobilität und ein abnormes Elutionsprofil bei der Isoenzym-

bestimmung auf Anionenaustauschern zeigten. Die Isoenzymbestimmung mit Ionenaustauschchromatographie und dem Immuninhibitionstest täuschten bei diesen Patientenserum hohe Kreatinkinase-MB-Werte vor. Im Rahmen der Diagnostik fielen sieben Patienten mit normaler bis deutlich erhöhter Gesamt-Kreatinkinase und einem ungewöhnlich hohen Anteil (Quotient 0,76 bis 1,50) der Kreatinkinase-MB im Immuninhibitionstest auf. Bemerkenswerterweise persistierten diese Enzymaktivitäten im weiteren Krankheitsverlauf.

Die weiteren Untersuchungen zeigten, daß sowohl die "idiopathische Kreatinkinase-BB" als auch das atypische Isoenzym "CK-AT" der Literatur durch die Existenz von Makro-Kreatinkinasen erklärt werden können (8, 9, 10).

## Material und Methoden

Alle Seren wurden möglichst innerhalb von 48 h nach Blutentnahme analysiert oder nach Zusatz von 2-Mercaptoethanol (20 mmol/l) bei  $-18^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### Enzymbestimmungen

Aktivitätsbestimmungen der Kreatinkinase erfolgten mit der durch N-Acetyl-cystein aktivierten Methode (Boehringer, Mannheim, Nr. 126357). Die Kreatinkinase-Aktivität der Chromatographie-Fractionen wurde am aca von DuPont (DuPont de Nemours, Wilmington, Delaware, USA) gemessen; dabei wurden Probenmengen von 400, 500 oder 1000  $\mu\text{l}$  zusammen mit der entsprechenden Menge Wasser manuell unter Umgehung der Füllstation direkt in den "Testpack" injiziert.

### Ausschlußchromatographie

Jeweils 200  $\mu\text{l}$  Serum wurden an Säulen mit Sephadex G-200 (21  $\times$  0,9 cm, Pharmacia, Uppsala, Schweden) und Sephadex G-200 sf (22  $\times$  0,9 cm bzw. 55  $\times$  0,9 cm) als stationärer Phase chromatographiert. Als mobile Phase diente ein Puffer aus 50 mmol/l Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (E. Merck, Darmstadt, Nr. 8387), 20 mmol/l N-Acetyl-cystein (Merck Nr. 12422) und 2 mmol/l EDTA-di-Kaliumsalz (Riedel-de Haën, Seelze, Nr. 64072) von pH 7,0. Die Molekulargewichte der Kreatinkinasen ließen sich aus den  $K_{av}$ -Werten der Trennung an Sephadex G-200 sf (55  $\times$  0,9 cm) abschätzen (11).

### Ionenaustauschchromatographie

500  $\mu\text{l}$  oder 1000  $\mu\text{l}$  Serum wurden auf DEAE-Sephadex A-50 Fertigsäulen (15  $\times$  0,8 cm, Betthöhe circa 5 cm, Roche Diagnostics, Nutley, N.J., USA) aufgetragen, mit je 8 ml Trispuffer (50 mmol/l) im NaCl-Stufengradienten von 100 mmol/l (pH 8,0), 200 mmol/l (pH 8,0) und 500 mmol/l (pH 7,0) eluiert und in Fraktionen von 1 ml gesammelt. Die 1 ml-Fractionen der Eluate wurden zu den Hauptfraktionen A, B und C gepoolt und konzentriert (Amicon Konzentratoren B15, Amicon GmbH, Witten).

### Elektrophorese

Die Isoenzyme der Kreatinkinase wurden 150 min bei 4 V/cm und  $15^{\circ}\text{C}$  in Agarose-Gel (10 g/l) aufgetrennt (Multiphor, LKB, Bromma, Schweden). Trispuffer (pH 6,9), Reagenzien zur Darstellung der Isoenzyme und Kreatinkinase-Standard stammten von Sigma Chemie, München (Nr. 715-EP).

### Immunologische Untersuchungen

#### Inhibitionstest

Die Aktivität der Kreatinkinase-B-Unterheit im Serum wurde mit dem Merck-1-Test, CK-MB (Nr. 14300 u. Nr. 14326) bestimmt (1).

#### Präzipitationstest

Die Differenzierung der Kreatinkinase-Isoenzyme erfolgte mit präzipitierenden Antikörpern vom Hammel gegen Kreatinkinase-MM und Kreatinkinase-BB (Merck Nr. 11642 und Nr. 11643) entsprechend der Vorschrift (2).

#### Doppeldiffusions-Methode (Ouchterlony)

Zur Charakterisierung Kreatinkinase-bindender Immunglobuline diente die Ouchterlony-Technik in Agarosegel (10 g/l). Nach Ausbildung der Präzipitatschleifen durch spezifische Antisera gegen Immunglobuline vom Menschen (Anti-IgG Nr. 16577, Anti-IgA Nr. 5263, Anti-IgM Nr. 19127 der Behringwerke, Marburg und Anti-IgG Nr. 13198, Anti-IgA Nr. 23208, Anti-IgM Nr. 33218 von Molter, Heidelberg) und Staphylokokkenprotein A (Nr. P 8143, Sigma Chemie, München) wurden die Agarplatten gewässert und die Kreatinkinase-Aktivität analog der Elektrophorese-Technik nachgewiesen.

#### Quantitative Präzipitation der Kreatinkinase-Immunglobulin-Komplexe

Steigende Mengen Kreatinkinase-freier Antisera (Behringwerke) oder Staphylokokkenprotein A (Sigma Chemie) wurden den Patientenseren zugesetzt. Die Ansätze wurden wie im Präzipitationstest zur Isoenzymbestimmung (2) behandelt.

### Bindung von Kreatinkinase-Isoenzymen im Makro-Kreatinkinase-Serum

Durch Ionenaustauschchromatographie wurden die Kreatinkinase-Isoenzyme aus Seren von Patienten mit Muskeltrauma (Kreatinkinase-MM), Myocardinfarkt (Kreatinkinase-MM, Kreatinkinase-MB) sowie aus den Makro-Kreatinkinase-Seren Doe. und Far. (Kreatinkinase-BB) isoliert, elektrophoretisch auf die Isoenzymzusammensetzung geprüft und innerhalb von 12 h verarbeitet. Serum Doe. (3 ml) wurde durch Chromatographie an Sephadex G-200 (90  $\times$  2,5 cm) bei pH 3,2 (Glycinpuffer, 50 mmol/l) Kreatinkinase-frei gewonnen, mit Trispuffer (50 mmol/l) neutralisiert, auf 3 ml eingengt und auf Kreatinkinase-Aktivität geprüft. Jeweils 200  $\mu\text{l}$  dieses Kreatinkinase-freien Serums wurden mit 100  $\mu\text{l}$  einer Isoenzympräparation versetzt, 5 h (Kreatinkinase-MB zusätzlich 18 h) bei  $22^{\circ}\text{C}$  inkubiert und an Sephadex G-200 sf (22  $\times$  0,9 cm) chromatographiert, um Makro-Kreatinkinase nachzuweisen.

## Ergebnisse

### Immunologische Isoenzymbestimmungen

Die Ergebnisse der beiden immunologischen Kreatinkinase-Isoenzym-Bestimmungen sind in Tab. 1 zusammengefaßt. In sechs der sieben Patientenseren waren außerordentlich hohe Anteile von Kreatinkinase-BB (Quotient 0,31 bis 0,91) an der Kreatinkinase-Gesamtaktivität nachweisbar. Nach der in l.c. (2) aufgeführten Formel (Kreatinkinase-MB = Gesamt-Kreatinkinase - (Kreatinkinase-MM + Kreatinkinase-BB)) errechneten sich auch im Immunpräzipitations-Test beträchtliche Anteile an Kreatinkinase-MB (Quotient bis 0,38 im Serum Ung.). Abweichend verhielt sich hier das Serum Hai. (Tab. 1, Pat. 3); seine Isoenzym-Zusammensetzung war immunologisch nicht bestimmbar, da es weder mit Anti-Kreatinkinase-BB- noch mit Anti-Kreatinkinase-MM-Serum reagierte.

### Ausschlußchromatographie

Die Abbildungen 1a–c zeigen die Chromatogramme nach Auftrennung der Patientenseren an Sephadex. Aufgrund ihrer geringen Elutionsvolumina konnten in allen sieben Seren Makro-Kreatinkinasen nachgewiesen werden. Neben großmolekularer Kreatinkinase (Peak M) war regelmäßig Kreatinkinase mit "normalem" Molekulargewicht (Peak N) vorhanden. Deren Anteil variierte von Patient zu Patient und betrug im Serum Far. (Abb. 1, c) rund 0,50, im Serum Doe. weniger als 0,10. Nur Säulen (55  $\times$  0,9 cm) mit Sephadex G-200 sf als stationärer Phase erzielten basisliniengetrennte Kreatinkinase-Aktivitätspeaks. Dafür waren Trennzeiten von etwa 24 h erforderlich. Ein auf 22  $\times$  0,9 cm reduziertes Bettvolumen ergab noch befriedigende Trennleistungen; doch benötigte die Chromatographie weiterhin einige Stunden (Abb. 1, c). Erst Sephadex G-200-(21  $\times$  0,9 cm) ermöglichte Auftrennungen in weniger als einer Stunde (Abb. 1 b). Die Auflösung der beiden Kreatinkinase-Fractionen war zwar reduziert, für den Nachweis von Makro-Kreatinkinase neben normaler Kreatinkinase jedoch ausreichend.

Tab. 1. Patienten mit Makro-Kreatinkinase: Diagnosen und Ergebnisse der immunologischen Isoenzymbestimmungen.

Patient	Geschlecht, Alter (a)	Diagnosen	Gesamt- Kreatin- kinase	Kreatinkinase-MB- Nachweis durch Im- muninhibition <sup>+</sup>	Quotient	Anteil der Kreatinkinase-Isoenzyme an der Gesamt-Kreatinkinase nach Immun- präzipitation <sup>++</sup>		Kontrolle <sup>+++</sup>
			(U/l)	(U/l)		Kreatin- kinase-MM Quotient	Kreatin- kinase-BB Quotient	
1. Ung., E.	♀, 45	Urticaria pigmentosa	91	71	0,78	0,0	0,62	pos.
2. Rei., G.	♀, 73	Coloncärcinom	106	123	1,16	0,18	0,67	pos.
3. Hai., E.	♀, 74	Coloncärcinom	152	172	1,13	1,10	1,10	neg.!
4. Doe., E.	♀, 59	Myocardinfarkt	131	120	0,92	0,06	0,91	pos.
5. Pfe., H.	♀, 45	Colitis ulcerosa	76	73	0,96	0,11	0,79	—
6. Far., R.	♀, 77	Myocardinfarkt, Apoplekt. Insult	82	62	0,76	0,50	0,31	pos.
7. Dob., L.	♀, 66	Koronare Herz- Krankheit	50	75	1,50	0,0	0,80	pos.

+ Inhibitions Test (Merck-1-Test CK-MB, No. 14 300)

++ Präzipitations Test (Merck No. 11 642 und No. 11 643)

+++ Positive Kontrolle: Zugabe von Anti-Kreatinkinase-BB- und Anti-Kreatinkinase-MM-Serum führt zur vollständigen Präzipitation der Kreatinkinase-Aktivität.

Negative Kontrolle: Gemeinsame Zugabe von Anti-Kreatinkinase-BB und Anti-Kreatinkinase-MM bewirkt keine Präzipitation.

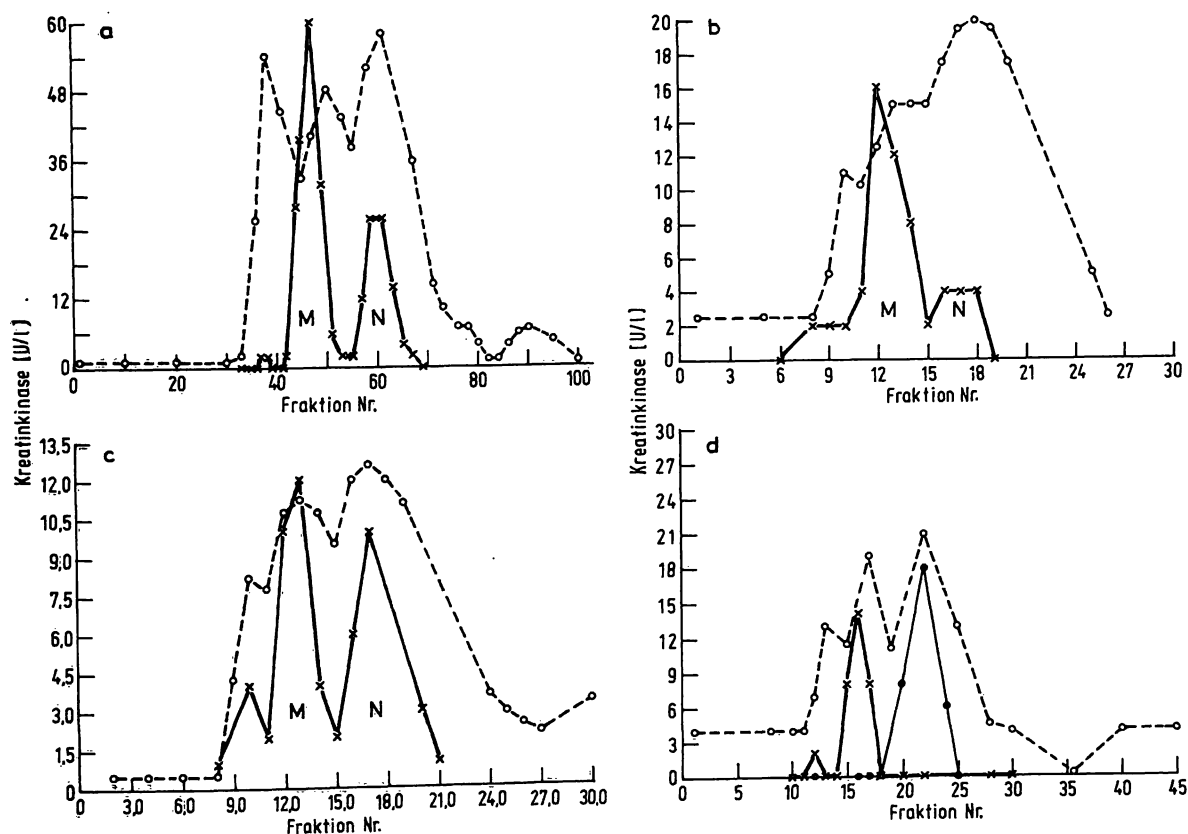


Abb. 1. Chromatographie von 200 µl Serum an Sephadex. x—x: Kreatinkinase-Aktivität. M: Makro-Kreatinkinase, N: normale Kreatinkinase. o—o—o: Absorbance bei 254 nm.

a) Serum Rei. Sephadex G-200 sf (55 x 0,9 cm)

b) Serum Ung. Sephadex G-200 (21 x 0,9 cm)

c) Serum Far. Sephadex G-200 sf (22 x 0,9 cm)

d) Rekombinationsversuch: x—x: mit Kreatinkinase-BB

•—•: mit Kreatinkinase-MB oder Kreatinkinase-MM

Tab. 2. Abschätzung der Molekulargewichte von Makro-Kreatinkinasen nach Chromatographie an Sephadex G-200 sf. Säule: 55 x 0,9 cm,  $V_0$ : 17,5 ml,  $V_t$ : 32,4 ml.

Patient	V <sub>e</sub>	K <sub>av</sub> -Wert	M <sub>r</sub>	
Ung., E.	19,5	0,14	350000	Makro-CK Kreatin- kinase
	23,9	0,43	80000	
Rei., G.	20,1	0,18	300000	Makro-CK Kreatin- kinase
	24,1	0,44	78000	
Hai., E.	19,2	0,11	350000	Makro-CK Kreatin- kinase
	24	0,43	80000	
Doe., E.	19,5	0,13	350000	Makro-CK Kreatin- kinase
	18,0	0,04	650000	
	24	0,42	85000	
<i>Referenzproteine</i>				
Albumin	24,5	0,48	65000	
β-Lipo- protein	20,3	0,18	260000	
Ig G	22	0,30	160000	
α <sub>2</sub> - Makro- globulin	17,6	0,01	> 700000	

Eine Abschätzung der Molekulargewichte von Makro-Kreatinkinasen ist aus den Chromatogrammen möglich. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

#### Ionenaustauschchromatographie

In der hier benutzten Ionenaustausch-Chromatographie wurden Kreatinkinase-MM in Fraktion A, Kreatinkinase-MB in Fraktion B und Kreatinkinase-BB in Fraktion C eluiert. In Abbildung 2 sind charakteristische Chromatogramme von Makro-Kreatinkinase-Seren dargestellt. Überraschend fand sich in allen drei Fraktionen Kreatinkinase-Aktivität. Allerdings unterschieden sich die Elutionsprofile von Serum zu Serum. Nahezu die gesamte Kreatinkinase-Aktivität des Serums Hai. erschien in Fraktion A (Abb. 2c), während die übrigen Seren beträchtliche Aktivitäten in den Fraktionen B und C aufwiesen (Abb. 2a und 2b).

In Abhängigkeit von der Reaktionszeit zwischen Serum und Ionenaustauscher änderten sich die Kreatinkinase-Elutionsprofile. Bei längerer Einwirkdauer des Anionenaustauschers fiel eine Aktivitätszunahme in Fraktion C auf Kosten der Fraktion A auf. Abbildung 3 zeigt dieses bemerkenswerte Verhalten am Beispiel der Seren Doe. und Ung. Lediglich für das Makro-Kreatinkinase-Serum Hai. war dieser Effekt nicht nachweisbar.

#### Elektrophorese

Abbildung 4 zeigt die Elektropherogramme der Kreatinkinase-Isoenzyme. Charakteristisch für alle Makro-Kreatin-

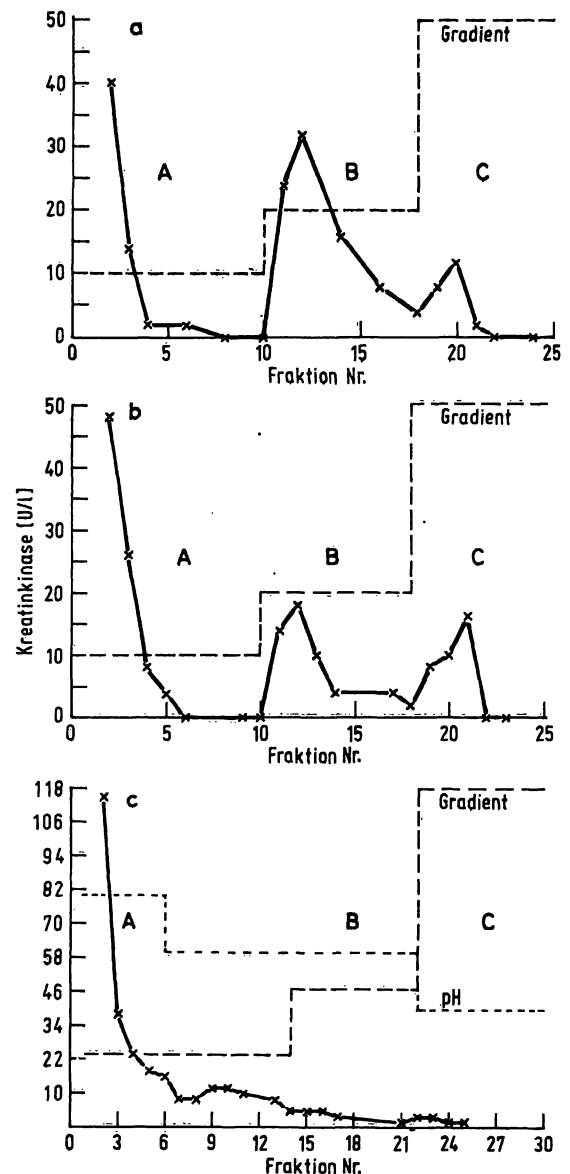


Abb. 2. Chromatographie an DEAE-Sephadex A-50.

x-x-x: Kreatinkinase-Aktivität  
 ----: Verlauf des Stufengradienten: 100, 200 und 500 mmol/l NaCl in 50 mmol/l Tris Puffer.  
 .....: Verlauf des pH Wertes während des Gradienten.

a) Serum Pfe.  
 b) Serum Rei.  
 c) Serum Hai.

kinase-Seren waren atypische Fraktionen zwischen den Isoenzymen Kreatinkinase-MM und Kreatinkinase-MB im Bereich der Auftragsstelle. Zusätzlich ließen sich wechselnde Anteile von Kreatinkinase-MM darstellen; im Serum Far. (Makro-Kreatinkinase und Herzinfarkt) fand sich eine diskrete Kreatinkinase-MB-Bande. In keinem dieser Seren war elektrophoretisch jedoch Kreatinkinase-BB nachzuweisen.

Erst die elektrophoretische Analyse der Fraktionen A, B und C der Ionenaustausch-Chromatographie (Abb. 2) zeigte, daß die Fraktion C ausschließlich aus Kreatinkinase-BB bestand, während die Fraktionen A und B überwiegend die atypische Kreatinkinase enthielten.

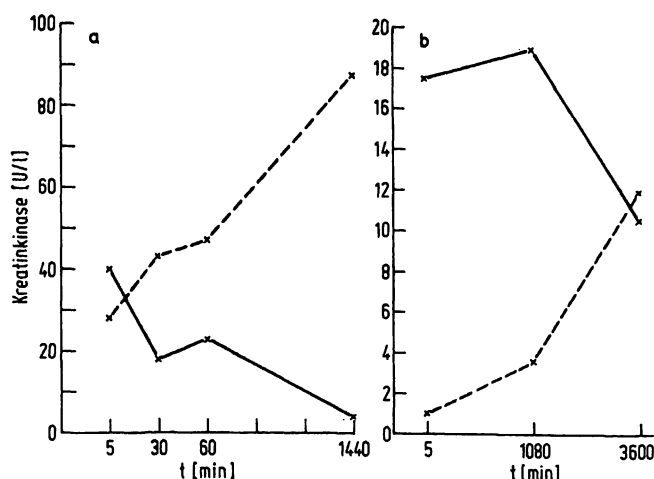


Abb. 3. Einfluß der Reaktionszeit zwischen Serum und Ionenaustauscher auf die Aktivitäten der Fraktionen A und C. Die Aktivitätszunahme in Fraktion C beruht auf der Abspaltung von Kreatinkinase-BB aus der Makro-Kreatinkinase.

x—x—x: Kreatinkinase-Aktivität der Fraktion A  
 x---x---x: Kreatinkinase-Aktivität der Fraktion C  
 (Kreatinkinase-BB)

a) Serum Doe.

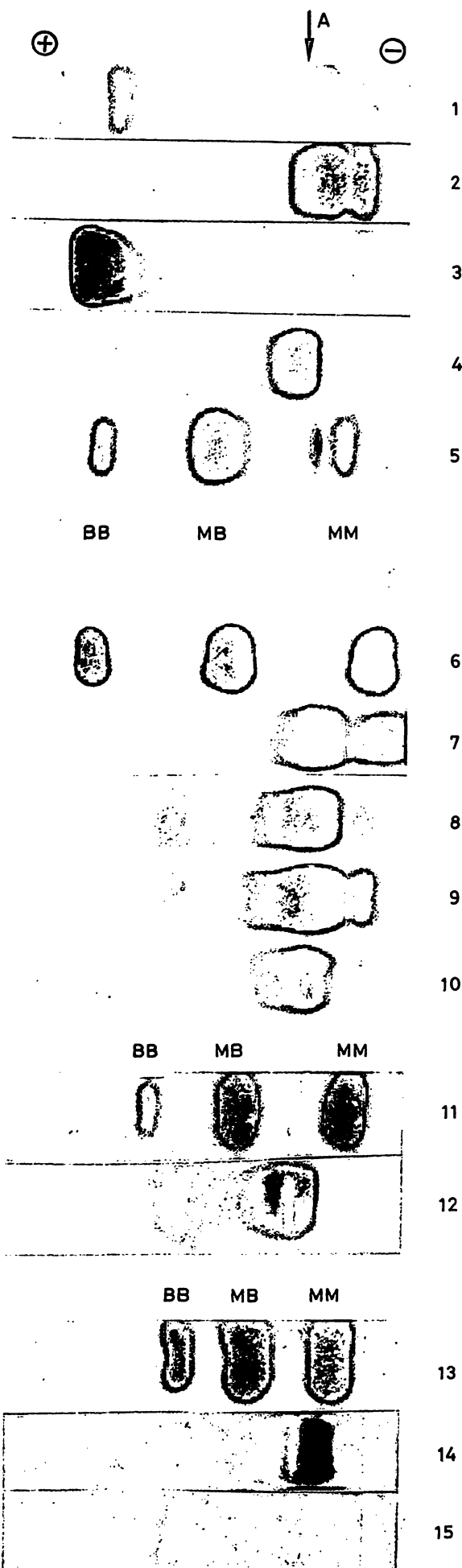
b) Serum Ung.

#### Nachweis von Kreatinkinase-bindenden Immunglobulinen

Mit schwachkettenpezifischen Antiseren gegen Human-IgG ließ sich im Serum Doe. mit der *Ouchterlony*-Technik (Tab. 3) und in der quantitativen Immunpräzipitation Immunglobulin G als makromolekularer Bindungspartner der Kreatinkinase-BB ermitteln (10). Auch in der Präzipitatsichel, die sich zwischen dem Serum Rei. und Anti-IgG-Serum ausgebildet hatte, lag Kreatinkinase-Aktivität vor (Tab. 3). Bei den übrigen Seren waren die Präzipitatsicheln gegen IgG-, IgA- und IgM-Globuline ohne Kreatinkinase-Aktivität. Mit Staphylokokkenprotein A (12) ließ sich in beiden Techniken — außer bei Serum Hai. — IgG als Bestandteil der Makro-Kreatinkinase nachweisen. Die Präzipitationskurven zweier Patientenserum sind in Abbildung 5 dargestellt.

Abb. 4. Elektrophoretische Auftrennung der Kreatinkinase-Isoenzyme auf Agarosegel (10 g/l).

- 1: Serum Far., Fraktion C nach Ionenaustausch (Kreatinkinase-BB).
- 2: Serum Far.
- 3: Serum Doe., Fraktion C nach Ionenaustausch (Kreatinkinase-BB).
- 4: Serum Doe.
- 5: Standard
- 6: Standard
- 7: Serum Hai.
- 8: Serum Ung.
- 9: Serum Rei.
- 10: Serum Dob.
- 11: Standard
- 12: Serum Pfe.
- 13: Standard
- 14: Serum Ung.
- 15: Serum Ung., Fraktion C nach Ionenaustausch (Kreatinkinase-BB).
- A: Auftragsstelle



Tab. 3. Nachweis von IgG als Bestandteil von Makro-Kreatinkinasen in der Doppeldiffusions-Methode (*Ouchterlony*). Im positiven Fall findet sich Kreatinkinase-Aktivität in der Präzipitationssichel.

Patient	Anti-Ig G (Behring)	Anti-Ig G (Molter)	Staphylokokken Protein A
1. Ung., E.	—	—	+
2. Rei., G.	—	+	+
3. Hai., E.	—	—	—
4. Doe., E.	+	—	+
5. Pfe., H.	—	—	+
6. Far., R.	—	—	+
7. Dob., L.	—	—	+

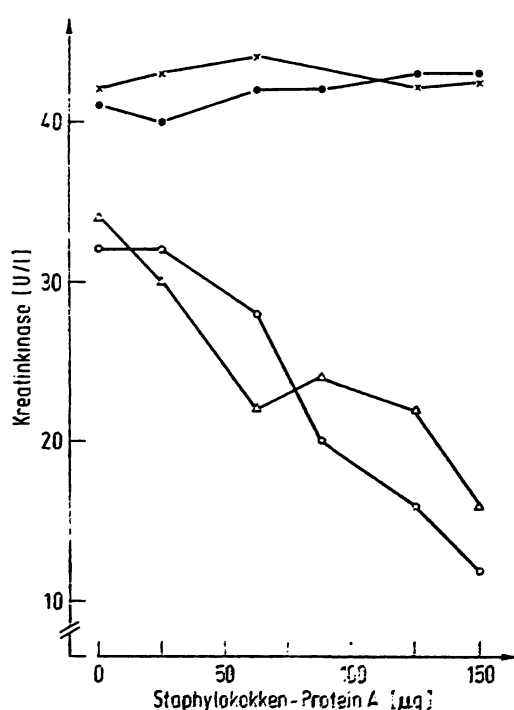


Abb. 5. Präzipitationskurven. Abnahme der Kreatinkinase-Aktivität im Überstand nach Präzipitation der IgG-gebundenen Kreatinkinase durch Staphylokokken-Protein A.  
 ○—○—○: Serum Doe.  
 △—△—△: Serum Rei.  
 ●—●—●: Serum eines Patienten mit Myositis.  
 ×—×—×: Serum eines Patienten mit Myokardinfarkt.

Die Ausschluß-Chromatographie nach Rekombination von Kreatinkinase-freiem Serum mit Isoenzympräparationen zeigt Abbildung 1 d. Nur das Isoenzym Kreatinkinase-BB bildet mit dem Serum Doe. Makro-Kreatinkinase. Mit Kreatinkinase-MM und Kreatinkinase-MB entstand innerhalb von 5 h bzw. 18 h keine Makro-Kreatinkinase.

## Diskussion

Das Isoenzym Kreatinkinase-BB (brain type creatine kinase) kommt im Serum nur in Spuren vor (13) und wird mit den üblichen Methoden nicht erfaßt. Vereinzelt wurde über erhöhte Kreatinkinase-BB-Aktivitäten in Patientenserum berichtet. Ihre biologische Bedeutung blieb unerkannt. In der "Diagnostik" zeigten die Seren mit idiopathischer Kreatinkinase-BB hohe Kreatinkinase-MB-Werte im Immuninhibitionstest und erhöhte Kreatinkinase-BB-Aktivitäten im Präzipitationstest. Die vermutete Koinzidenz von idiopathischer Kreatinkinase-BB oder atypischer Kreatinkinase mit kardiologischen Erkrankungen (3,5,14) war wegen der gezielten Isoenzymbestimmung bei diesem Patientengut unseres Erachtens eher zufällig. Gemeinsam war diesen Patienten höheres Lebensalter, Überwiegen des weiblichen Geschlechts und die Persistenz der Kreatinkinase-Aktivitäten. Die erhöhte Gesamt-Kreatinkinase und der abnorme Kreatinkinase-MB/Gesamt-Kreatinkinase-Quotient ließen sich bei der Patientin Ung. 15 Monate und bei der Patientin Doe. 9 Monate zurückverfolgen.

Die Diagnose "Makro-Kreatinkinase-Ämie" ist mit der beschriebenen Ausschlußchromatographie innerhalb von 2 Stunden möglich. Die Molekulargewichte der Makro-kreatinkinasen unserer Patientenserum lagen um 350 000; damit war das Vorliegen von mitochondrialer Kreatinkinase (CK-MiMi) (15) oder Adenylatkinase (ATP:AMP Phosphotransferase; EC 2.7.4.3) ausgeschlossen. Im Serum Doe. fanden sich konstant zwei Aktivitätsgipfel, die Molekulargewichten von 350 000 und 650 000 entsprachen.

Auch elektrophoretisch boten die Makro-Kreatinkinase-Seren ein einheitliches Bild. Hier imponierte eine atypische Aktivitätsbande zwischen den Isoenzymen Kreatinkinase-MM und Kreatinkinase-MB.

Sax et al. (5) sowie Chemnitz et al. (14) beschrieben ähnliche elektrophoretische Bilder, wiesen jedoch keine makromolekulare Kreatinkinase nach, Urdal et al. (8) und eigene Untersuchungen (9,10) zeigten erstmals die Zusammenhänge zwischen "atypischer Kreatinkinase" in der Elektrophorese, makromolekularer Enzymform und persistierend erhöhter Enzymaktivität.

Weitere Eigenschaften der Makro-Kreatinkinase konnten durch die Chromatographie an Anionenaustauschern erfaßt werden; Makro-Kreatinkinase-Moleküle dissoziierten während der Chromatographie und führten zum Auftreten des Isoenzym Kreatinkinase-BB. Dieser zeitabhängige Vorgang (Abb. 3) dürfte auf Interaktionen zwischen Makro-Kreatinkinase und Ionenaustauscher beruhen und ist eine Ursache von Fehlinterpretationen chromatographischer Isoenzymbestimmungen.

Der Nachweis von Immunglobulin als Komponente der Makro-Kreatinkinase erfolgte hier durch Präzipitationsmethoden, die auch die Aufklärung von Makro-Amylasen (16) und Makroformen der alkalischen Phosphatasen (17)

als Immunglobulin-Enzym-Komplexe ermöglichten. In den Seren Doe. und Rei. präzipitierte die Makro-Kreatinkinase mit Anti-IgG-Seren. Von sechs Makro-Kreatinkinase-Seren ließ sich die Kreatinkinase-Aktivität durch Staphylokokken-Protein A, das gegen den Fc-Teil von IgG gerichtet ist, fällen. Ein Ausbleiben der Präzipitation ((18), Serum Hai.) schließt die Existenz eines Kreatinkinase-Immunglobulinkomplexes nicht zwangsläufig aus; es ist denkbar, daß vorliegende Immunkomplexe die Reaktion mit spezifischen Antiseren verhindern. Eine Dissoziation von Makro-Kreatinkinase während der Fällungsversuche konnte durch Analyse der Überstände ausgeschlossen werden.

In freier Form besitzt Kreatinkinase-BB von allen Isoenzymen die kürzeste Halbwertszeit (19). Die Bindung von Kreatinkinase-BB an Immunglobuline verändert offenbar den Katabolismus des Enzyms wesentlich und kann die Persistenz der Enzymaktivitäten im Blut der Patienten erklären.

An einem Makro-Kreatinkinase-Serum wurde nachgewiesen, daß dessen Immunglobuline nur Kreatinkinase-BB,

nicht dagegen Kreatinkinase-MM oder Kreatinkinase-MB binden (Abb. 1 d). Unterschiedliche Affinität und Spezifität der Enzym-Immunglobulin-Bindung lassen ein weites Spektrum physikochemischer, immunologischer und kinetischer Eigenschaften von Makro-Kreatinkinase-Komplexen erwarten. Mit methodischen Störungen bei der Analytik von Kreatinkinase-Isoenzymen muß bei Anwesenheit von Makro-Kreatinkinase gerechnet werden: In den hier untersuchten Seren von sieben Patienten führte die Makro-Kreatinkinase-BB zu erhöhten und persistierenden "Kreatinkinase-MB-Werten" bei den immunologischen und chromatographischen Isoenzymbestimmungen und zu einer atypischen Kreatinkinase-Bande in der Elektrophorese.

#### Danksagung

Wir danken Herrn Dr. *Bottesch* (Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach) für Ionenaustauschersäulen, Herrn Dr. *Münscher* (Behringwerke, Marburg) für Kreatinkinase-freie Antiimmungglobulinseren und Herrn Prof. Dr. *Rick* für die Überlassung eines Makro-Kreatinkinase-Serums.

#### Literatur

- Würzburg, U., Hennrich, N., Lang, H., Prellwitz, W., Neumeier, D. & Knedel, M. (1976), *Klin. Wochenschr.* 54, 357–360.
- Würzburg, U., Hennrich, N., Ort, H.-D., Lang, H., Prellwitz, W., Neumeier, D., Knedel, M. & Rick, W. (1977), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 15, 131–137.
- Lang, H., Würzburg, U., Neumeier, D., Knedel, M., Prellwitz, W., Kattermann, R., Schlebusch, H. & Schürmann, J. (1978) *Klin. Wochenschr.* 56, 641–646.
- Sieg, J., Gauchel, F. D. & Herrschaft, H. (1977), *Dtsch. Med. Wochenschr.* 102, 1647–1649.
- Sax, S. M., Moore, J. J., Giegel, J. L. & Welsh, M. (1976) *Clin. Chem.* 22, 87–91 und (1979) *Clin. Chem.* 25, 535–541.
- Ljungdahl, L. & Gerhardt, W. (1978) *Clin. Chem.* 24, 832–834.
- Fiolet, J. W. T., Willebrands, A. F., Lie, K. I. & Ter Welle, H. F. (1977) *Clin. Chim. Acta* 80, 23–35.
- Urdal, P. & Landaas, S. (1979) *Clin. Chem.* 25, 461–465.
- Stein, W. & Bohner, J. (1979) *Clin. Chem.* 25, 1513–1514.
- Bohner, J., Stein, W., Kuhlmann, E. & Eggstein, M. (1979) *Clin. Chim. Acta* 97, 83–88.
- Sephadex, Gelfiltration in theory and practice (1973) Pharmacia, Uppsala, Schweden (Firmenschrift).
- Grov, A., Oeding, P., Myklestad, B. & Austen, J. (1970) *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 78 B, 106–111.
- Jung, K., Neumann, R., Cobet, G., Nugel, E. & Egger, E. (1979) *Clin. Chim. Acta* 91, 165–168.
- Chemnitz, G., Jockers-Wretou, G. E., Schmidt, E., Schmidt, F. W. & Lobers, J. (1979) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 146.
- Deus, B., Schiessel, C., Blum, H. E. & Gerok, W. (1979) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 1139.
- Kobayashi, T., Nakayama, T. & Kitamura, M. (1978) *Clin. Chim. Acta* 86, 261–265.
- Crofton, P. M. & Smith, A. F. (1978) *Clin. Chim. Acta* 83, 235–247.
- Yuu, H., Takagi, Y., Senju, O., Hosoya, J., Gomi, K. & Ishii, T. (1978) *Clin. Chem.* 24, 2054–2057.
- Rapaport, E. (1975) *Cardiovasc. Res.* 9, 473.

Dr. Jürgen Bohner  
Dr. Dr. Wolfgang Stein  
Medizinische Klinik, Abt. IV  
Otfried-Müller-Str. 10  
D-7400 Tübingen

